

ВЛИЯНИЕ *HinFI*-ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА ГИПОФИЗАРНОГО ФАКТОРА РОСТА *bPit-1* НА ПРИЗНАКИ МОЛОЧНОЙ ПРОДУКТИВНОСТИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА ГОЛШТИНСКОЙ И БЕЛОРУССКОЙ ЧЕРНО-ПЕСТРОЙ ПОРОД

ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси»
Республика Беларусь, 220072, ул. Академическая, 27

Введение

В настоящее время в большинстве стран Европы, где ведется интенсивная селекционная работа, широкое распространение получили современные биотехнологии, способные повысить точность и эффективность традиционной селекции. К ним относится маркер-сопутствующая селекция, которая сочетает информацию о полиморфных вариантах генов-кандидатов с данными об их фенотипическом проявлении. Поиск генов-кандидатов ведется среди генов соматотропинового каскада, которые регулируют не только ростовые процессы, но и лактацию у млекопитающих, в частности, крупного рогатого скота. Интенсивность экспрессии данных генов находится под контролем клеток гипоталамической области, выделяющих стимулирующий релизинг-фактор – соматолиберин (*Pit1*). Поэтому любые мутации, изменяющие экспрессию гена *Pit-1*, могут влиять на работу всего каскада и представляют собой интерес для возможного применения в MAS-селекции. В Беларуси исследования в этом направлении находятся на начальном этапе развития, но, несомненно, имеют большое практическое значение.

Нами был исследован *bPit-1*-*HinFI*-полиморфизм, обусловленный G→A заменой в шестом экзоне [1, 2]. Данный полиморфизм

не сопровождается изменением аминокислотной последовательности белка и, тем не менее, является общепринятым молекулярным маркером продуктивности у молочных пород крупного рогатого скота. Данные об ассоциации *bPit-1*-*HinFI*-полиморфизма с такими признаками молочной продуктивности, как общий удой за 305 суток лактации, жирномолочность и белковомолочность у коров голштинской и белорусской черно-пестрой пород в Беларуси получены нами впервые.

Объект исследования – популяции крупного рогатого скота голштинской и белорусской черно-пестрой пород. Интерес к голштинской породе обусловлен тем, что ее представители являются мировыми лидерами молочной продуктивности и активно используются белорусскими селекционерами для повышения продуктивности пород, разводимых на территории Беларуси. Представители белорусской черно-пестрой породы, несмотря на более низкий уровень молочной продуктивности, адаптированы к условиям климата, кормовой базе и обладают устойчивым иммунитетом к заболеваниям, распространенным на территории Республики Беларусь.

Материалы и методы

Материалом для исследования послужили образцы ДНК, выделенные из проб крови коров, предоставленных животноводческими предприятиями Минской области. Источником данных о продуктивности являлись племенные карты, заполняемые зоотехниками-селекционерами для каждого животного.

Статистическая оценка проведена с использованием стандартного пакета программ «STATISTICA 6.0» (*StatSoft, Ink. 1994-2001*).

Так как число выявленных животных с редкими генотипами не позволяет определить характер распределения исследуемых параметров в этих группах, то оценка количествен-

ных признаков осуществлялась с использованием методов непараметрической статистики. Данные представлены в виде M_e (25%; 75%), где M_e – медиана признака – мера центральной тенденции, характеризующая срединное положение признака в вариационном ряду. Интерквартильный размах признака описывается с помощью 25% и 75% процентилей – (верхняя граница 1-го и нижняя граница 4-го квартилей) [3].

Оценка влияния генотипа на исследуемые признаки проводилась путем сравнения показателей продуктивности в группе животных с определенным генотипом и выборкой в целом. Статистический анализ результатов осуществлялся с помощью серийного критерия г Вальда-Вольфовица. Данный критерий является чувствительным к любым различиям распределения в выборках и применим при оценке малого числа наблюдений, что позволяет проводить анализ продуктивности животных с редкими генотипами. Проверяется H_0 гипотеза о том, что сравниваемые группы принадлежат к одной генеральной совокупности. Если нулевая гипотеза отклоняется ($p < 0,05$), то следует принять альтернативную гипотезу о существовании различий [4].

Полученные данные во всех случаях рассматривались как статистически значимые при $p < 0,05$.

Определение генотипа исследуемых осо-

бей осуществлялось методом ПЦР–ПДРФ (полимеразная цепная реакция – полиморфизм длин рестрикционных фрагментов).

Условия ПЦР следующие: - 94 °С - 1 мин; (95 °С - 45 сек; 56 °С - 1 мин; 72 °С - 2 мин) x 35 циклов; 72 °С - 10 мин [5]. Длина амплифицируемого фрагмента составляет 451 п.н. Праймеры для амплификации имеют следующие последовательности:

bPit-1-HinFI-F: 5'-aaaccatcatctcccttctt-3'

bPit-1-HinFI-R: 5'-aatgtacaatgtgccttctgag-3'

Оценка результатов ПЦР проводилась с помощью рестриктазы *HinFI*, разрезающей амплифицируемый фрагмент в случае присутствия нуклеотида А (такой аллель обозначен как *bPit-1-HinFI^B*). Разделение продуктов рестрикции проводилось методом электрофореза в 2% агарозном геле. Визуализация продуктов рестрикции осуществлялась путем окрашивания бромидом этидия. У животных с генотипом *bPit-1-HinFI^{AA}* на электрофореграмме наблюдался один фрагмент длиной 451 п.н. У животных с генотипом *bPit-1-HinFI^{BB}* наблюдаемых фрагментов было два: 244 и 207 п.н. Гетерозиготные генотипы *bPit-1-HinFI^{AB}* на электрофореграмме визуализировались как полосы, характерные для обоих полиморфных вариантов гена *bPit-1*: 451, 244 и 207 п.н. На рисунке 1 приведена электрофореграмма продуктов рестрикции наблюдаемых при обработке амплификатов рестриктазой.

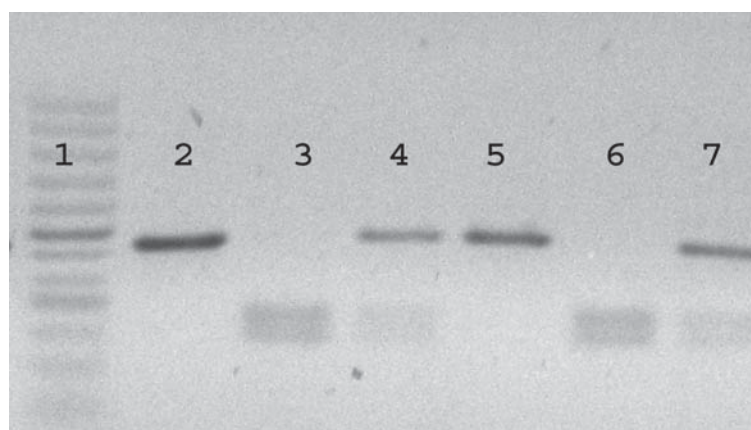


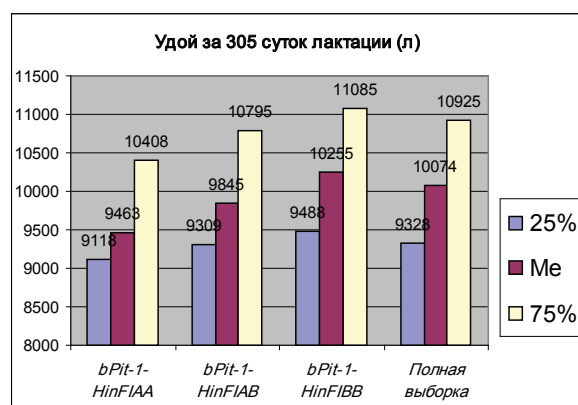
Рис. 1. Электрофореграмма результатов ДНК-типирования *bPit-1-HinFI*-полиморфизма в 2% агарозном геле

Условные обозначения: 1 - маркер 50 br DNA Ladder (Fermentas); 2 - продукт амплификации;
3, 6 - генотип *bPit-1-HinFI^{BB}*; 4, 7 - генотип *bPit-1-HinFI^{AB}*; 5 - генотип *bPit-1-HinFI^{AA}*

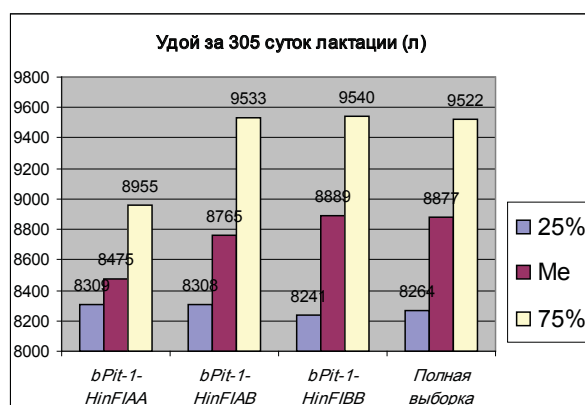
Результаты и обсуждение

В ходе эксперимента проведено ДНК-типирование 109 особей голштинской и 302 особей черно-пестрой породы. Выявлены животные с генотипами *bPit-1-HinFI^{AA}*, *bPit-1-HinFI^{AB}* и *bPit-1-HinFI^{BB}*. Аллель *bPit-1-HinFI^A* в обеих выборках является более редким.

Исследование влияния генотипа по полиморфизму *HinFI* гена *bPit* на **общую продуктивность молока** за лактацию показало, что у коров обеих пород предпочтительным является аллель *bPit-1-HinFI^B* (рис. 2а, б).



2 а



2 б

Рис. 2. Показатели общей молочной продуктивности у коров с различными генотипами:
2а-голлштинская порода; 2б-черно-пестрая порода

У коров голштинской породы наблюдается возрастание значения медианы и интерквартильного размаха: 9463 (9118; 10408), 9845 (9309; 10795) и 10255 (9328; 10925) литра для животных с генотипами *bPit-1-HinFI^{AA}*, *bPit-1-HinFI^{AB}* и *bPit-1-HinFI^{BB}* соответственно. Срединное значение медианы по выборке составляет 10074 литра, интерквартильный размах 9328; 10925, что значительно ниже по сравнению с группой животных с генотипом *bPit-1-HinFI^{BB}*. Среди коров черно-пестрой породы отмечается такая же тенденция: 8475 (8309-8955), 8765 (8308-9533) и 8877 (8264-9522) литра для животных с генотипами

bPit-1-HinFI^{AA}, *bPit-1-HinFI^{AB}* и *bPit-1-HinFI^{BB}* соответственно, при среднем значении медианы выборки 8877 (8264; 9522) литра. То есть, в выборках обеих пород значение медианы в группах животных гомозиготных по предпочтительному аллелю *bPit-1-HinFI^B* выше, чем значения медиан для этих выборок в целом.

Результаты статистической оценки достоверности выявленных тенденций с помощью серийного критерия *r* Вальда-Вольфовица приведены в таблице 1 и подтверждают отличие групп животных с генотипами *bPit-1-HinFI^{AB}* и *bPit-1-HinFI^{BB}* от выборки в целом.

Таблица 1

Результаты применения серийного критерия *r* Вальда-Вольфовица для сравнения групп коров с генотипами *bPit-1-HinFI^{AB}* и *bPit-1-HinFI^{BB}* с выборкой в целом по признаку общего удоя

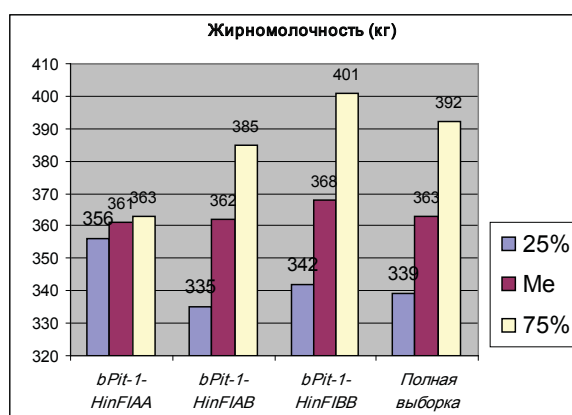
Порода	Генотип	<i>bPit-1-HinFI^{AA}</i>	<i>bPit-1-HinFI^{AB}</i>	<i>bPit-1-HinFI^{BB}</i>
Голштинская	Количество особей	5	36	68
	Значение <i>p</i> статистики*	0,60	0,00	0,00
Черно-пестрая	Количество особей	14	108	180
	Значение <i>p</i> статистики*	0,60	0,00	0,00

* Полученные данные статистически значимы при $p < 0,05$.

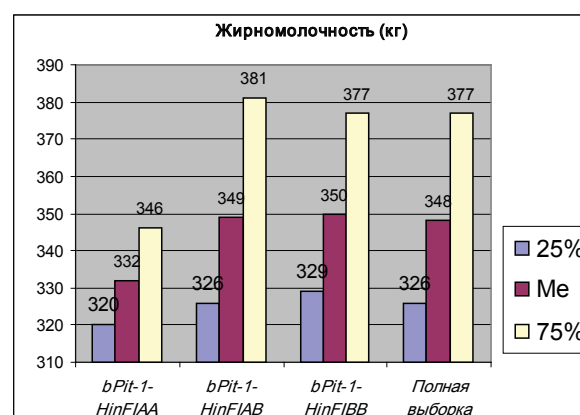
Исследование влияния генотипа на **жирномолочность** показало, что по этому признаку аллель *bPit-1-HinFI^B* также является предпочтительным у коров обеих пород.

Относительно влияния генотипа на показатель жирномолочности прослеживается тенденция, аналогичная отмеченной выше для общего удоя. В выборках обеих пород наблюдается возрастание этого показателя от животных с генотипом *bPit-1-HinFI^{AA}* к группе с генотипом *bPit-1-HinFI^{AB}* и *bPit-1-HinFI^{BB}*. Так среди коров голштинской породы значение медианы и интерквартильного размаха для всей выборки

составляет 363 (339; 392) кг. Значения медианы и интерквартильного размаха по этому параметру составляет 361 (356; 363), 362 (335; 385) и 368 (342; 401) кг для животных с генотипами *bPit-1-HinFI^{AA}*, *bPit-1-HinFI^{AB}* и *bPit-1-HinFI^{BB}* соответственно. Среди коров черно-пестрой породы значения медиан и интерквартильного размаха составляют 332 (320; 346), 349 (326; 381) и 348 (326; 377) кг для животных с генотипами *bPit-1-HinFI^{AA}*, *bPit-1-HinFI^{AB}* и *bPit-1-HinFI^{BB}* соответственно, при значении медианы и интерквартильного размаха для всей выборки 348 (326; 377) кг (рисунок 3а, б).



3а



3б

Рис. 3. Показатели жирномолочности у коров с различными генотипами:

3а-голштинская порода; **3б**-черно-пестрая порода

Несмотря на то, что уровни продуктивности молочного жира у коров с генотипами *bPit-1-HinFI^{AA}*, *bPit-1-HinFI^{AB}* и *bPit-1-HinFI^{BB}* в некоторых случаях рознятся незначительно, результаты серийного критерия *r*

Вальда-Вольфовица подтверждают отличие распределения данного признака в группах коров с генотипом *bPit-1-HinFI^{AB}* и *bPit-1-HinFI^{BB}* от общей выборки у представителей обеих пород (табл. 2).

Таблица 2

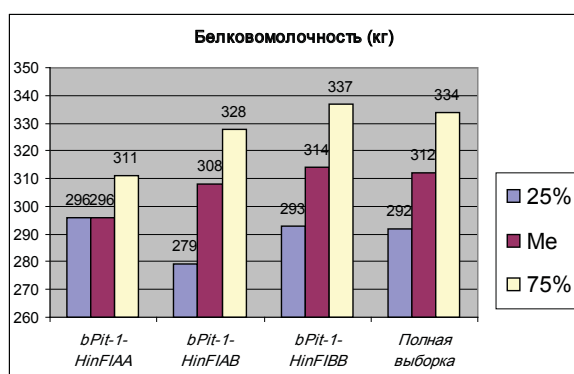
Результаты применения серийного критерия *r* Вальда-Вольфовица для сравнения групп коров с генотипами *bPit-1-HinFI^{AB}* и *bPit-1-HinFI^{BB}* с выборкой в целом по признаку общего удоя

Порода	Генотип	<i>bPit-1-HinFI^{AA}</i>	<i>bPit-1-HinFI^{AB}</i>	<i>bPit-1-HinFI^{BB}</i>
Голштинская	Количество особей	5	36	68
	Значение <i>p</i> статистики*	0,60	0,00	0,00
Черно-пестрая	Количество особей	14	108	180
	Значение <i>p</i> статистики*	0,40	0,00	0,00

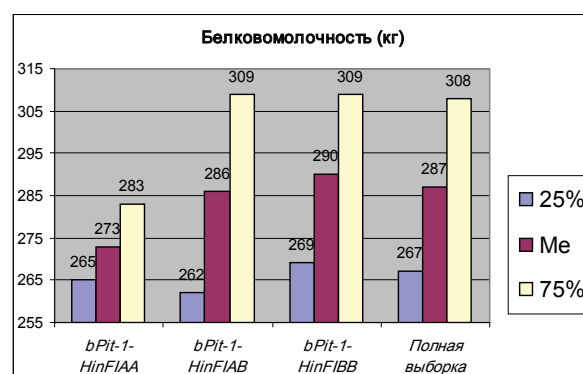
* Полученные данные статистически значимы при $p < 0,05$.

Исследование влияния генотипа по *HinFI*-полиморфизму гена *bPit-1* на **белковомолочность** у коров голштинской и черно-пестрой пород показало, что по этому признаку, так же, как по признаку общей молочной продуктивности и жирномолочности, предпочтительным среди представителей обеих пород является наиболее распространенный аллель *bPit-1-HinFI^B*. В этом случае также наблюдается повышение показателя продуктивности от животных с генотипом *bPit-1-HinFI^{AA}* к генотипу *bPit-1-HinFI^{AB}* и *bPit-1-HinFI^{BB}* у коров обеих исследуемых пород. Так, у коров голштинской породы срединное

значение белковомолочности по выборке в целом составляет 312 кг, интерквартильный размах 292; 334. Значение медиан и интерквартильный размах в группах коров с генотипами *bPit-1-HinFI^{AA}*, *bPit-1-HinFI^{AB}* и *bPit-1-HinFI^{BB}* составляет 296 (296; 311), 303 (279; 328) и 314 (293; 337) соответственно. У коров черно-пестрой породы значение медиан и интерквартильный размах в группах коров с генотипами *bPit-1-HinFI^{AA}*, *bPit-1-HinFI^{AB}* и *bPit-1-HinFI^{BB}* составляет 273 (265; 283), 286 (262; 309) и 290 (269; 309) соответственно, при срединном значении выборки в целом 287 (267; 308) (рис. 4 а, б).



4 а



4 б

Рис. 4. Показатели белковомолочности у коров с различными генотипами:
4 а - голштинская порода; 4 б - черно-пестрая порода

Как видно из диаграммы, в выборках обеих пород животные с генотипом *bPit-1-HinFI^{BB}* демонстрируют более высокий уровень продуктивности молочного белка, по сравнению с группами животных с генотипами *bPit-1-HinFI^{AB}* и *bPit-1-HinFI^{AA}*, и выборкой в целом.

Результаты применения серийного критерия *r* Вальда-Вольфовица для статистической оценки отмечаемых тенденций подтверждают отличие распределения данного признака в группах коров с генотипом *bPit-1-HinFI^{AB}* и *bPit-1-HinFI^{BB}* от такового в общей выборке у представителей обеих пород (табл. 3).

Таблица 3

Результаты применения серийного критерия *r* Вальда-Вольфовица для сравнения групп коров с генотипами *bPit-1-HinFI^{AB}* и *bPit-1-HinFI^{BB}* с выборкой в целом по признаку общего удоя

Порода	Генотип	<i>bPit-1-HinFI^{AA}</i>	<i>bPit-1-HinFI^{AB}</i>	<i>bPit-1-HinFI^{BB}</i>
Голштинская	Количество особей	5	36	68
	Значение <i>p</i> статистики*	0,61	0,03	0,00
Черно-пестрая	Количество особей	14	108	180
	Значение <i>p</i> статистики*	0,40	0,00	0,00

* Полученные данные статистически значимы при $p < 0,05$.

В работе R. Renaville (1997 г) показано, что аллель *bPit-1-HinFI^A* ассоциирован с повышенной продуктивностью молока и молочного белка и более низким содержанием молочного жира у животных голштинской породы [5]. L. Zwierzchowski в 2002 году при изучении польского черно-пестрого скота также подтвердил наличие положительной ассоциации *bPit-1-HinFI^A* аллеля с ежедневной продуктивностью молока, однако содержание молочного жира в данном исследовании у животных – обладателей аллеля *bPit-1-HinFI^A* было также выше, чем у животных – носителей аллеля *bPit-1-HinFI^B*, по сравнению с данными Renaville [6]. В 2004 г. K. De Mattos выявил, что гетерозиготные *bPit-1-HinFI^{AB}* Гур быки более предпочтительны по сравнению с *bPit-1-HinFI^{BB}* быками по молочной продуктивности их дочерей [7].

Эти отличия в эффекте данного полиморфизма у представителей различных пород позволяют предположить, что, возможно, с геном *bPit1* сцеплен другой функциональный локус, который собственно и влияет на молочную

продуктивность и который расположен в непосредственной близости от локуса *bPit-1-HinFI* [8]. Другим объяснением такого эффекта, по мнению M. Mukesh (2008), может служить присутствие дополнительного генетического фактора. Длительная дивергенция между *B. Indicus* и *B. Taurus* могла привести к возникновению некоторых геномных различий. Поэтому, возможно, что присутствие одинаковых аллелей отличается по физиологическому эффекту у различных пород [9].

В таком случае, применение данного полиморфизма в качестве генетического маркера по признакам молочной продуктивности требует дополнительных исследований по каждой породе. Однако, по данным, полученным нами для коров голштинской и черно-пестрой породы белорусского разведения, аллель *bPit-1-HinFI^B* положительно ассоциирован с такими признаками молочной продуктивности, как общий удой молока за 305 суток лактации, жирномолочность и белкомолочность, и может быть рекомендован в качестве генетического маркера.

Заключение

Исследование ассоциации полиморфизма *HinFI* гена *bPit* с признаками молочной продуктивности выявило общие тенденции для выборок коров как голштинской, так и черно-пестрой пород белорусского разведения:

1. У представителей обеих пород аллель *bPit-1-HinFI^B* является предпочтительным по трем исследуемым параметрам молочной продуктивности: удой за 305 суток лактации, жирномолочность и белкомолочность.

2. Также по трем исследуемым признакам молочной продуктивности животные с гено-

типом *bPit-1-HinFI^{BB}* превосходят гетерозиготы, а те, в свою очередь, особей с генотипом *bPit-1-HinFI^{AA}*.

3. У представителей обеих пород показатели продуктивности животных с генотипом *bPit-1-HinFI^{BB}* по трем признакам превышают таковые по отношению ко всей выборке в целом.

Таким образом, аллель *bPit-1-HinFI^B* может быть рекомендован в качестве генетического маркера молочной продуктивности голштинской и черно-пестрой пород крупного рогатого скота.

Список использованных источников

1. Woollard, J. Rapid communication: *HinFI*-polymorphism at the bovine *Pit1* locus / J. Woollard, C. B. Schmitz, A. E. Freeman, C. K. Tuggle // J. Anim. Sci. – 1994. – Vol. 72. – P. 3267.

2. Dierkes, B. Partial genomic structure of the bovine *Pit-1* gene and characterization of a *HinFI* transition polymorphisms in exon 6 / B. Dierkes, B. Kriegesmann, B. G. Baumgarthne, B. Breining

// Anim. Genet. – 1998. – Vol. 29. – P. 405.

3. Реброва, О. Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA. М., МедиаСфера, 2002. 312 с.

4. Гублер, Е. В., Генкин А. А. Применение непараметрических критериев статистики в медико-биологических исследованиях. Ленинград, Медицина 1973. 142 с.

5. Renaville, R. Pit-1 gene polymorphism, milk yield, and conformation traits for Italian Holstein-Friesian bulls / R. Renaville, N. Gengler, E. Vrech, A. Prandi, S. Massart, C. Corradini // *J. Dairy Sci.* – 1997. – Vol. 80, №12. – P. 3431 – 3438.
6. Zwierzchowski, L. Effect of polymorphisms of growth hormone(GH), Pit-1, and leptin (LEP) genes, cow's age, lactation stage and somatic cell count on milk yield and composition of Polish Black-and-White cows / L. Zwierzchowski, J. Krzyzewski, N. Strzalkowska, E. Siadkowska, A. Ryniewicz // *Anim. Sci. Pap. Rep.* – 2002. – Vol. 20. – P. 213–227.
7. De Mattos, K.K. Association of bGH and Pit-1 gene variants with milk production traits in dairy Gyr bulls / K.K. De Mattos, S.N. Del Lama, M.L. Martinez, A. Freitas, F. Braz // *J. Agric. Res.* – 2004. – Vol. 39. – P. 147–150.
8. Edriss, V. Pit1Gene polymorphism of Holstein Cows in Isfahan Province / V. Edriss, H. R. Rahmani // *Biotechnology* – 2008. – Vol. 7, № 2. – P. 209–212.
9. Mukesh, M. Analysis of bovine pituitary specific transcription factor–HinF I gene polymorphism in Indian zebuine cattle / M. Mukesh, R.C. Sodhi, Sobti, B. Prakash, R.A. Kaushik, K. Aggarwal // *Livestock Science* – 2008. – Vol. 113. – P. 81–86.

Дата поступления статьи 29 ноября 2010 г.